Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H.P.R. Seeliger

UNTERSUCHUNG ÜBER DAS HÄMOLYSIN DER SEROVARIETÄT 5 VON LISTERIA MONOCYTOGENES

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Gerhard Pongratz
aus Amberg

Würzburg, den 20. Januar 1982

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H.P.R. Seeliger

UNTERSUCHUNG ÜBER DAS HÄMOLYSIN DER SEROVARIETÄT 5 VON LISTERIA MONOCYTOGENES

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Gerhard Pongratz
aus Amberg

Würzburg, den 20. Januar 1982

Referent:	Professor Dr. med. H.P.R. Seeliger
Korreferent:	Professor Dr. med. H. Hof
Dekan:	Professor Dr. med. K.A. Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 19.2.1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät

der Universität Würzburg

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1,	Einleitung	1
2.	Problemstellung	1
3.	Material und Methoden	5
3.1	Art und Herkunft des Untersuchungsmaterials	5
3.1.1	Kulturen	5
3.1.2	Blutplatten	5
3.1.3	Präparation der Erythrozytensuspensionen	6
3.2	Biologische und biochemische Reaktionen und Untersuchungen	7
3.2.1	Bestimmung der hämolytischen Aktivität	7
3.2.2	Bestimmung des Proteingehaltes	8
3.2.3	Bestimmung der Lezithinaseaktivität	8
3.2.4	Quantitative Bestimmung des Bakterienwachstums	8
3.3	Gewinnung des Hämolysins von L.m. Sv 5	8
3.3.1	Herstellung Inokulums zur Hämolysinproduktion	8
3.3.2	Hämolysinausscheidung während des Bakterienwachstums	9
3.3.3	Herstellung des "Rohhämolysins"	9
3.4	Reinigung des Hämolysins	10
3.4.1	Ammoniumsulfatfällung	10
3.4.2	Entsalzung und Pufferwechsel	10
3.4.3	Gelfiltration	10
3.5	Physico-chemische Eigenschaften des Hämolysins	11
3.5.1	Bestimmung des isoelektrischen Punktes	11
3.5.2	Bestimmung des Molekulargewichtes	11
3.5.3	Wirkung von reduzierenden Substanzen	12
3.5.4	Wirkung von Trypsin und Pronase	12
3.6	Serologische Untersuchungen	13
3.6.1	Herstellung der Antigene	13

Seite

3.6.2	Gewinnung von Antiseren	14
3.6.3	Quantitativer Antihämolysin-Neutralisationstest	14
3.6.4	Qualitativer Test zur Neutralisierung der Hämolyse auf Blutagar	15
3.6.5	ELISA zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Hämolysin	16
3.6.6	Anti-Streptolysin 0-Neutralisationstest und Anti- α -Staphylolysin-Neutralisationstest	17
3.6.7	0-Agglutinations-Röhrchentest	17
3.6.8	Immunodiffusionstest	17
4.	Ergebnisse	19
4.1	Kulturelles Verhalten von L. m. Sv 5 auf Blut- und Eigelbagar	19
4.1.1	Hämolytische Aktivität auf Schafblutagar	19
4.1.2	Lipolytische Aktivität auf Eigelbagar	20
4.2	Herstellung und Reinigung des Hämolysins	20
4.3	Physico-biochemische Eigenschaften des Hämolysins	24
4.3.1	Isoelektrischer Punkt	24
4.3.2	Molekulargewicht	25
4.3.3	Wirkung von reduzierenden Substanzen	26
4.3.4	Verhalten des Hämolysins bei verschiedenen Temperaturen	27
4.3.5	Wirkung von Trypsin und Pronase	27
4.3.6	Wirkung von Cholesterin	28
4.3.7	Aktivität des Hämolysins gegenüber Erythrozyten verschiedener Spezies	29
4.4	Ergebnisse der serologischen Untersuchungen	30
4.4.1	Antigenetische Wirkung des Hämolysins in den Reihenverdünnungstests	31
4.4.2	Qualitativer Test zur Neutralisation der Hämolyse auf Blutagar	32
4.4.3	Homogenitätstest in der Immunodiffusion	33

Seite

5.	Diskussion	34
6.	Zusammenfassung	39
7.	Literaturverzeichnis	41
8.	Rezepte	46

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543526_0005

1. EINLEITUNG

1957 beschrieb IVANOV 57 Stämme von Listeria monocytogenes, die er von abortierten Lämmern isoliert hatte, und einen weiteren Listeria-Stamm, isoliert von einem neugeborenen Lamm mit Enteritis (IVANOV 1957). Diese Stämme ließen sich nicht in die bis dahin bekannten Serovar-Schemen nach H- und 0-Antigenen (PATERSON 1940, DONKER-VOET 1957, SEELIGER 1958) einordnen. Nach weiteren Untersuchungen und Isolierungen solcher Stämme wurden diese schließlich taxonomisch als neue Serovarietät 5 (Serovar 5 bzw. Sv 5) eingeordnet. Ihr hervorstechendstes Merkmal ist - in den Untersuchungen immer hervorgehoben (IVANOV 1957, IWANOW 1962; DONKER-VOET 1972; HUNTER 1973; COOPER et al. 1973a, 1973b; COOPER/DENNIS 1978) - die ungewöhnlich deutlich ausgeprägte, große Hämolysezone bei Kultivierung auf Schaf- oder Pferdeblutagar.

In der vorliegenden Arbeit soll diese besonders augenfällige Fähigkeit zur Hämolyse von Listeria monocytogenes Sv 5 unter verschiedenen Gesichtspunkten und Fragestelleungen näher untersucht werden.

2. PROBLEMSTELLUNG

Zu den charakteristischen Merkmalen der Listeria monocytogenes, wie sie synoptisch von SEELIGER (1958, 1961) beschrieben sind, gehören neben den typischen kulturellen und biochemischen Eigenschaften das Auftreten einer Monocytose nach (experimenteller) Infektion, die serologische Identifizierbarkeit der Stämme mittels 0- und H-Antigenen sowie eine ß-Hämolyse insbesondere auf Schafblutagar.

Diese Lyse von roten Blutkörperchen ist auf ein vom Bakterium produziertes, filtrierbares, lösliches Hämolysin zurückzuführen (BURN 1935; HARVEY/FABER 1941; SEELIGER 1958; 1961). Zu besonderen Fragestellungen über dieses Hämolysin, wie etwa Ausscheidungskinetik, biochemische Struktur und Eigenschaften, gibt es bislang nur verhältnismäßig wenig Unterlagen. Für spezielle Untersuchungen wurde - mit zum Teil recht unterschiedlichen Ergebnissen - versucht, das Hämolysin in wechselnd hohem Reinheitsgrad darzustellen (JENKINS/WATSON 1969, 1971; SIDDIQUE et al. 1974).

Die bisherigen Ergebnisse lassen das Hämolysin von Listeria-Stämmen, die nicht der Sv 5 angehören, als thermolabiles, durch Cholesterin hemmbares, toxisches Protein charakterisieren, das überdies antigenetisch wirksam ist (NJOKU-OBI et al. 1963; GIRARD et al. 1963, JENKINS et al. 1964; SIDDIQUE 1969; JENKINS/WATSON 1971; WILLIAMS/SIDDIQUE 1972; SIDDIQUE et al. 1974). Zusammen mit Streptolysin O, θ-Toxin von C. perfringens, Cereolysin von B. cereus und anderen Toxinen ist es in die gemeinsame Gruppe der "SH-aktivierten Cytolysine" eingeordnet worden (SMYTH/DUNCAN 1978). Antiseren gegen gewisse Hämolysine dieser Toxingruppe haben dabei die besondere Eigenschaft, wiederum auch andere Cytolysine dieser Gruppe zu neutralisieren (SHANY et al. 1973; BERNHEIMER 1976).

Über das Hämolysin von Listeria monocytogenes Sv 5 liegen kaum spezielle Untersuchungen vor. Antiserum gegen eine Hämolysinpräparation von Sv 5 konnte die hämolytische Aktivität neutralisieren, jedoch wurden in der Immunodiffusion keine Präzipitationsreaktionen beobachtet (COOPER et al. 1973 b).

Neue Aspekte in der Bewertung des Hämolysins brachte eine Beobachtung von SEELIGER (1961), der die ß-Hämolyse von Listeria-Stämmen, die nicht der Sv 5 angehören, mit ihrer Fähigkeit zur positiven Reak-

tion auf Eigelbagar in Verbindung brachte.

Dagegen stellten COOPER et al. (1973a) bei der Untersuchung von vier stark hämolytischen Stämmen von Sv 5 jeweils Lezithinase-negatives Verhalten fest. Weitere Sv 5-Stämme wurden bisher nicht auf lipolytische Aktivität überprüft.

In der Listerioseforschung ist übrigens nach wie vor unklar, welche Rolle dem Hämolysin von Listeria monocytogenes in der Pathogenese zukommt.

Die bisher untersuchten Hämolysine von Listeria-Stämmen, die nicht der Sv 5 angehörten, hatten zwar auch cytotoxische Eigenschaften gegenüber diversen Zellsystemen erkennen lassen (NJOKU-OBI et al. 1963, SIDDIQUE 1969, LEMELAND et al. 1974) und wiesen bei in-vivo-Untersuchungen verschiedene pathophysiologische Wirkungen auf (SIDDIQUE/WILLIAMS 1969, SIDDIQUE/COOPER 1969, SIDDIQUE et al. 1969, JENKINS/WATSON 1969, SWORD/KINGDON 1971, WIGGINS et al. 1974); jedoch ist im Zusammenhang mit der Rolle des Hämolysins in der Pathogenese der Listeriose noch weitgehend offen, ob dabei überhaupt Hämolysin gebildet wird.

Die folgenden Untersuchungen konzentrieren sich auf das Hämolysin der Listeria monocytogenes Sv 5.
Ziel der experimentellen Untersuchungen war es, mit geeigneten Methoden dieses Hämolysin nach Eigenschaften und Verhalten näher zu charakterisieren und damit vielleicht auch einen Beitrag in der Diskussion über die Rolle des Hämolysins als möglicherweise pathogenetisches Agens bei einer Infektion mit Listeria monocytogenes zu liefern.

Im einzelnen befaßt sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Fragestellungen:

1. Welcher Zusammenhang besteht zwischen dem Wachstum der Listerien und der Ausscheidung ihres Hämolysins?

2. Welche typischen Merkmale weist das Hämolysin hinsichtlich seiner hämolytischen Aktivität auf?

3. Gibt es Hinweise auf Beziehungen zwischen der hämolytischen Aktivität und einer möglicherweise doch lipidspaltenden Eigenschaft von Listeria monocytogenes Sv 5?

4. Welche charakteristischen physico-chemischen Eigenschaften weist das Hämolysin auf?

5. Ist das Hämolysin antigenetisch wirksam?

6. Gibt es Hinweise für immunologische Kreuzneutralisierungsreaktionen von Anti-Serovar 5-Hämolysin mit Toxinen anderer Bakterienspezies oder Hämolysinen stark hämolysierender Stämme anderer Serovare von L. monocytogenes?

7. Gibt es Anhaltspunkte dafür, daß das Hämolysin bei einer Infektion mit Listeria monocytogenes Sv 5 gebildet wird?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 ART UND HERKUNFT DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS

3.1.1 Kulturen

Alle Stämme wurden der Sammlung des Listeria-Forschungslabors im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg (SLCC) entnommen.
Für die jeweilige Fragestellung wurden folgende Stämme benutzt:

Übersicht 1:

SLCC Stammnr.	Serovar	Source	Einsender/Ort	Jahr
2373	3a	Mensch	Nyfeldt/Kopenhagen	
2374	4a	Hirn/Schaf	Gill/Neuseeland	1931
2379	5	Schaf	Ivanov/Bulgarien	1957
2098	5	Leber/Schaf	Dennis/Perth/ Australien	1963
3769	5	Gras	Weiss/Freiburg	1973
4729	5	Nasentupfer/ Rind	Stolle/Berlin	1976

L. monocytogenes Sv 3a, SLCC Nr. 2373; und Sv 5, SLCC Nr. 2379 wurden zur Hämolysinherstellung verwendet. Zusätzlich wurden 53 weitere Sv 5-Stämme anderer Herkunft untersucht.

3.1.2 Blutagarplatten

10 % Schafblutagar-Platten mit 4% Agar-Basismedium (Blood agar base, Oxoid) wurden routinemäßig verwendet. In 3.8 % Natriumcitrat aufgenommenes Schafblut wurde dreimal unter sterilen Bedingungen in 0.9 % NaCl gewaschen, dann auf das Originalvolumen aufgefüllt und dem Basismedium zugegeben.

3.1.3 Präparation der Erythrozytensuspensionen

Für Routinezwecke wurden Kaninchenerythrozytensuspensionen verwendet.

Die in 3.8 % Natriumcitrat aufgenommenen Erythrozyten werden dreimal in steriler isotoner Phosphat-gepufferter NaCl (PPS)(pH 6.7) gewaschen und zu einer 3%igen Lösung suspendiert.

Um möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, empfiehlt es sich, Erythrozytensuspensionen mit exakt eingestellter Konzentration zu verwenden.

Eine 3%ige Erythrozytensuspension wird durch photometrische Bestimmung ihres Hämoglobingehaltes wie folgt standardisiert:

Die roten Blutkörperchen von 0,5 ml der einzustellenden Suspension werden durch Zugabe von 10 ml 0,04 %(V/V) NH_4OH lysiert; nach Abzentrifugieren der Erythrozytenfragmente (1500 x g, 5 Min.) wird die optische Dichte (o.D.) des Hämolysats photometrisch (Zeiss-Spektralphotometer PMQ II, Wellenlänge 541 µm) bestimmt.

Durch Zugabe von gewaschenem Vollblut bzw. PPS werden die verwendeten Suspensionen so eingestellt, daß sie nach vollständiger Lyse unter den angegebenen Bedingungen eine o.D. von 0,315 aufweisen.

In der gleichen Weise präpariert man Erythrozytensuspensionen genau standardisierter Konzentration, wenn Blut anderer Spezies verwendet wird.

Die Suspensionen wurden nur innerhalb 12 Stunden nach Blutabnahme für die Untersuchungen benützt.

Blut vom Kaninchen, Meerschweinchen und Schaf stammte vom Tierbestand des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie, Affen- und Kückenblut vom Institut für Virologie, Katzen- und Rattenblut vom zentralen Tierstall des Kopfklinikums der Universität Würzburg.

Vom Städtischen Schlachthof Würzburg wurden freundlicherweise Schweine- und Rinderblut und von einem Würzburger Reitstall Pferdeblut zur Verfügung gestellt.

3.2 BIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE REAKTIONEN UND UNTERSUCHUNGEN

3.2.1 Bestimmung der hämolytischen Aktivität

Zur Erstellung einer Eichkurve, aus der sich vom Hämoglobingehalt des Testansatzes auf den Anteil der lysierten roten Blutkörperchen schließen läßt, werden bestimmte Volumina der zuvor eingestellten Erythrozytensuspension mit 0.04 % NH_4OH lysiert und von den Lysaten die o.D. photometrisch bestimmt.

Wie orientierende Vorversuche ergaben, besteht im Bereich von 30 % bis 70%iger Hämolyse eine lineare Abhängigkeit zwischen der Hämolysinkonzentration und der Menge freigesetzten Hämoglobins und damit dem Anteil der lysierten Erythrozyten.

Als Bezugspunkt für die Aktivitätsbestimmung des Hämolysins wird deshalb eine 50%ige Lyse der roten Blutkörperchen gewählt.

Eine Einheit hämolytischer Aktivität (haemolytic unit, HU) wird definiert als der reziproke Wert der höchsten Verdünnung des Hämolysins, die eine Lyse von 50 % der Erythrozyten ergibt. Dazu werden mit dem Verdünnungsfaktor 2 in geometrischer Reihe 0.5 ml Hämolysin mit 0.5 ml PPS (pH 6.7) durch Überpipettieren verdünnt. Nach Zugabe von 0.5 ml Erythrozytensuspension werden die Röhrchen unter kurzem Aufschütteln 25 Min. bei 37°C bebrütet. Nach Abzentrifugieren (1500 x g, 4°C) liest man bei den Röhrchen die Verdünnungsstufe ab, bei der ungefähr 50 % der Erythrozyten lysiert werden.

In einem Ansatz im Reagenzglas mit 0.5 ml vorverdünntem Hämolysin, 0,5 ml Erythrozytensuspension und 0,5 ml PPS wird dann die hämolytische Aktivität endgültig bestimmt.

Nach 25 Min. Inkubation im Wasserbad bei 37°C (mit wiederholtem Aufschütteln) und anschließendem Zentrifugieren (1500 x g, 4°C) werden 0,2 ml des Hämolysats mit 0,5 ml PPS verdünnt; anschließend wird die o.D. im Photometer bestimmt.
Mit Hilfe des Ergebnisses aus der vorherigen Titration konnte man bei diesem Ansatz das Hämolysin so verdünnen, daß etwa 30% bis 70% der Erythrozyten (linearer Bereich) lysiert werden. Auf eine Aktivität des Hämolysins bei 50%iger Lyse wird dann nach folgender Formel interpoliert:

$$\frac{\text{O.D. 541 nm des Testansatzes}}{\text{O.D. 541 nm des Lysestandards bei 50\%iger Hämolyse}} \times \text{3x Vorverdünnung des Hämolysins}$$

= Anzahl an Einheiten hämolytischer Aktivität pro ml.

3.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteinanteil einer Probe wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt; Albumin von Rinderserum (Behringwerke, Marburg) diente dabei als Standard.

Die spezifische hämolytische Aktivität wurde ausgedrückt als Anzahl hämolytischer Einheiten (HU) pro Milligramm (mg) Protein.

3.2.3 Bestimmung der Lezithinase-Aktivität

Die Prüfung der Stämme auf Lezithinase-Aktivität erfolgte auf Eigelbagar nach den Methoden von Mc CLUNG/TOABE (1947) und von WILLIS (1958), in einer im Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg, üblichen Modifikation.

3.2.4 Quantitative Bestimmung des Bakterienwachstums

Die Zahl der vermehrungsfähigen Keime wird nach dem Standard-Platten-Gußverfahren durch Koloniezählung auf Tryptose-Hochschicht-Agar nach 24 Std. Bebrütung bei 37°C ermittelt.

Für Routinezwecke wird das Bakterienwachstum mit Hilfe photometrischer Bestimmung der Trübung des Nährmediums verfolgt (Zeiss-Spektralphotometer PMQ II, Wellenlänge 600 nm, steriles Nährmedium als Leerwert). Die Keimsuspension eines Testansatzes wurde dabei so mit dem sterilen Medium verdünnt, daß ihre o.D. im Bereich von 0,07 bis 0,5 liegt.

3.3 GEWINNUNG DES HÄMOLYSINS VON L. m Sv 5

3.3.1 Herstellung des Inokulums für Kulturen zur Hämolysinproduktion

Der Prüfstamm wird auf Schafblutplatte fraktioniert ausgestrichen, nach 48 Std. Wachstum bei 37°C werden zwei mittelgroße Einzelkolonien in je 4 ml Tryptose-Phosphat-Bouillon (Difco) eingerieben und nach kurzem kräftigen Aufschütteln 18 Std. bei 37°C stationär bebrütet.

Den Keimsuspensionsinhalt von 3 Röhrchen nimmt man in 190 ml eisgekühlte Brain-Heart-Infusion (BHI) auf, der 0,3 g Glucose/100 ml Bouillon zugesetzt werden (0,5 % Glucose-Gesamtkonzentration). Diese Kultur inkubiert man in 300 ml-Kolben bei 37°C unter ständigem Schütteln (GFL-Rotation-Shaker, 40 U.p.m.).

Nach 18 Stunden dient die gewachsene Keimmenge als Inokulum für Kulturen zur Hämolysinproduktion (vermehrungsfähige Keime: 7.8×10^9 bis 2.3×10^{10}/ml Suspension bei Stammnr. 2379 bzw. 2.5×10^9 bis 5×10^{10}/ml Suspension bei Stammnr. 4729) und wird im Verhältnis 1:20 in das neue Medium verimpft.

Nach jedem Schritt erfolgte Reinheitskontrolle durch Ausstreichen auf Schafblutagar.
Nach der Inokulation wird mit 0.1 N NaOH auf pH 7,15 eingestellt.

3.3.2 Hämolysinausscheidung während des Wachstums von L. monocytogenes Sv 5

10 ml der als Inokulum dienenden Keimsuspension (vgl. oben) werden in 190 ml BHI (0,5 % Glucose) verimpft. Nach Einstellung auf pH 7.15 läßt man 200 ml-Listeria-Kultur unter Ruhebedingungen bzw. unter ständigem Schütteln (40 U.p.m., GFL-Rotation-Shaker) in 300 ml-Kolben bei 37°C wachsen. Jede Stunde wird von den Kulturen ein Aliquot von 2.5 ml Keimsuspension entnommen; davon bestimmt man das Bakterienwachstum sowie nach Zentrifugation (9000 x g, 0°C) und Sterilfiltration (0.45 µm Sartorius-Membranfilter) die hämolytische Aktivität des zellfreien Überstandes.

3.3.3 Herstellung des "Rohhämolysins"

Nach der Einsaat des Inokulums (vgl. oben) läßt man insgesamt 3,5 l Keimsuspension (BHI, zusätzlich 0.3 % Glucose) in einem 6 l-Kolben unter ständigem Rühren im Brutschrank bei 37°C heranwachsen. Nach Erreichen des Optimums an Hämolysinausscheidung (nach etwa 7 1/2 Std.) werden die Zellen von 2,4 l der Listerienkultur abzentrifugiert (8000 x g, 2°C, 20 Min.).

Das so gewonnene Zellsediment wird in 350 ml eisgekühlten Akkumulationsmedium (1/7 des zuvor abzentrifugierten Kulturbouillonvolumens) suspendiert. Um Zellkonglomerate voneinander zu trennen, wird die Suspension 7 Min. mit 2,5 W/cm^2 beschallt und anschließend 80 Min. stationär bei 37°C im Wasserbad bebrütet (zwischendurch kurz aufschütteln).

Zur Reinheitskontrolle werden Ausstriche auf Schafblutagar angelegt.

Nach 80 Min. Bebrütung wird durch Zentrifugieren (10000 x g, 0°C, 20 Min.) der Überstand gewonnen und durch Acrodisc-Filter (0,45 µm Porengröße) steril filtriert. Zur Sterilitätskontrolle werden Ausstriche auf Schafblutagar angelegt und unter anaeroben und aeroben Bedingungen kultiviert.

Das Filtrat enthält das Hämolysin und wird als "Rohhämolysin" ("crude haemolysin") bezeichnet.

Zur Konservierung teilt man den sterilen Überstand in Portionen von etwa 18 ml; jede Fraktion wird mit 25 µl 1,27 M 2-Mercaptoäthanol versetzt und luftdicht verschlossen bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

3.4 REINIGUNG DES HÄMOLYSINS

3.4.1 Ammoniumsulfatfällung

In 35 ml des eisgekühlten sterilen Filtrats gibt man unter kurzem kräftigen Rühren 3.5 ml 1M Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH 7.3) und 25 µl 1,27 M 2-Mercaptoäthanol zu. In diese Flüssigkeit werden anschließend 18.9 g festes Ammoniumsulfat langsam innerhalb von 10 Min. eingerührt. Diese läßt man 12 bis 14 Stunden bedeckt im Eisbad stehen und zentrifugiert sie dann 10 Min. (0°C) bei 1200 x g.

Den Überstand prüft man auf hämolytische Aktivität und verwirft ihn, falls er weniger als 10 HU/ml aufweist. Den gewonnenen beigegrauen Niederschlag löst man in 7.5 ml PPS (pH 7.2). Diese Lösung wird in Fraktionen von je 2.5 ml aufgeteilt und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

3.4.2 Entsalzung und Pufferwechsel

Das nach der Ammoniumsulfatfällung in je 2,5 ml PPS gelöste Präzipitat wurde in mit 9.1 ml Sephadex G 25 medium-Gel gepackten Fertigsäulen (Columns PD 10, Pharmacia, Uppsala) entsalzt und in 4 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.3, zusätzlich 0.25 M NaCl) übergeführt.

3.4.3 Gelfiltration

Die weitere Reinigung dieser Hämolysinpräparation erfolgte durch Gelfiltration in einer Biogel P 200 mesh (Bio Rad. Lab., Richmond Calif.) Chromatographiesäule (1.5 cm x 100 cm, Gelbetthöhe 85 cm),

die mit 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.3, zusätzlich 0.25 M NaCl) äquilibriert wurde. Die Bestandteile der aufgetragenen Probe wurden mit dem Äquilibrierungspuffer in Einzelfraktionen von 1 ml/Röhrchen bei einer Flußrate von etwa 15 ml/Std. eluiert.

Die hämolytisch aktiven Fraktionen wurden vereinigt und - falls nötig - durch Ammoniumsulfatfällung (etwa 75% Sättigung) konzentriert. Danach wurde das Hämolysin wie oben angegeben, entsalzt bzw. in für die jeweiligen Zwecke geeignete Puffer übergeführt. Die so gewonnene Hämolysinpräparation wird im weiteren als "teilweise gereinigtes Hämolysin" ("partially purified haemolysin" = PPH) bezeichnet.

3.5 PHYSICO-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DES HÄMOLYSINS VON L.m. Sv 5

3.5.1 Bestimmung des isoelektrischen Punktes des Hämolysins

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) erfolgte im Flachbettverfahren (WINTER et al. 1975) in einer 4% (G/V) Gelsuspension (Ultrodex, LKB Produkter, Stockholm). Zum Aufbau des pH-Gradienten diente als Trägerampholyt eine 2 % (V/V) Ampholinelösung (LKB) im pH-Bereich 3,5-10. Nach einem Vorlauf von 12 bis 14 Std. bei 4 W (LKB-2117 Multiphor-Fokussierungsgerät) wurden 3 ml PPH (ca. 0.5 mg Protein/ml) auf das Gelbett aufgetragen und die Fokussierung 4 Std. lang bei 8 W fortgesetzt. Anschließend wurde das Gelbett in 30 gleiche Gelstreifen geteilt. Nach der pH-Messung wurden die einzelnen Fraktionen mit 1 ml 0.1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.2) eluiert, und das Eluat auf hämolytische Aktivität überprüft.

3.5.2 Bestimmung des Molekulargewichtes

Das Molekulargewicht des Hämolysins wurde durch Gelfiltration bestimmt. Dazu äquilibriert man eine Biogel P 200-Chromatographiesäule (1,5 cm x 100 cm, Gelbetthöhe 70 cm) mit 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.3, zusätzlich 0.25 M NaCl).
Als Markerproteine dienten:
Alkalische Phosphatase aus Kälberintestinum, MG 100000 (Sigma Chem., St. Louis) und Pferdehämoglobin, MG 68000 (Serva, Heidelberg). Die Hämolysinpräparation war das nach der Ammoniumsulfatfällung gelöste und entsalzte Präzipitat.
Das Probengemisch aus den Standardproteinen und der Hämolysinpräparation wird auf die Säule aufgetragen und mit dem Äquilibrierungs-

puffer in Einzelfraktionen von 1 ml/Röhrchen bei einer Flußrate von etwa 15 ml/Std. eluiert. Das Molekulargewicht des Hämolysins ergibt sich nach der Methode von ANDREWS (1965), indem man den Logarithmus der Molekulargewichte der Markerproteine gegen die Werte ihrer Elutionsvolumina aufträgt und dann auf dieser Geraden das zum Elutionsvolumen des Hämolysins gehörende Molekulargewicht ermittelt.

3.5.3 Wirkung von reduzierenden Substanzen auf das Hämolysin

Als Hämolysinpräparation wurde der sterilfiltrierte Überstand einer BHI-Kultur verwendet, die 8 Std. bei 37°C unter Ruhebedingungen angezüchtet wurde. Durch Lösen von L-Cystein · HCl (Serva, Heidelberg) bzw. $Na_2S_2O_4$ (Merck, Darmstadt) in PPS (pH 6.7) werden verschiedene Konzentrationen (10^{-1} M bis 10^{-4} M Cystein ·HCl bzw. 10^{-1} M bis 10^{-3} M $Na_2S_2O_4$) hergestellt. Die kontrollmäßige pH-Einstellung (pH 6.7) erfolgte mit 2N NaOH.

1 ml der Hämolysinpräparation versetzt man dann mit 1 ml der reduzierenden Substanz in der jeweiligen Konzentration. Nach 20 Min. Bebrütung bei Raumtemperatur (ca. 23°C) wurde davon die hämolytische Aktivität bestimmt.

Da das Hämolysin von Sv 4a bekanntlich durch reduzierende Substanzen aktivierbar ist (KHAN et al. 1973) wurde eine Hämolysinpräparation von einer 8 Std.-BHI-Ruhekultur von Sv 4a (SLCC Stammnr. 2374) gewonnen und gleichsam als Positivkontrolle denselben Versuchsbedingungen wie die Präparation von Sv 5 unterworfen.

3.5.4 Wirkung von Trypsin und Pronase auf das Hämolysin

Die Wirkung zwei verschiedener proteolytischer Enzyme auf PPH von Sv 5 wurde untersucht.

Dazu wurden mit PPS (pH 7.3) 0.02 % (G/V) Lösungen von Trypsin (Merck, Darmstadt, 130000 E/g) und 0.025 % (G/V) Lösungen von Pronase (Sigma Chem., St. Louis) hergestellt.

0.5 ml PPH und 0.5 ml der jeweiligen Enzymlösung wurden zusammen 20 Min. bei 37°C inkubiert; danach erfolgte die Bestimmung der hämolytischen Aktivität des Gemisches.

Als Leerwertkontrolle diente ein Ansatz gleicher Volumina PPH und PPS (pH 7.3), als Kontrolle eine Probe gleicher Volumina PPH und zuvor hitzeinaktivierter (15 Min. bei 100°C) Enzymlösungen.

Diese Ansätze wurden 20 Min. bei 37°C inkubiert, und davon anschließend die hämolytische Aktivität getestet.

3.5.5 Wirkung von Cholesterin auf das Hämolysin

Durch Lösen in Eisessig wurde eine 2.5 mM Stammlösung von Cholesterin (Merck, Darmstadt) hergestellt. Davon ausgehend kommt man durch Verdünnen mit 0.1 M Phosphatpuffer zu verschiedenen Konzentrationen von Cholesterin (0.5 µM bis 12.5 µM). 1 ml vorverdünntes PPH und 1 ml dieser Lösungen werden vermischt und 10 Min. bei Raumtemperatur (ca. 23°C) inkubiert; anschließend wurde die hämolytische Aktivität dieser Proben bestimmt. Um zu testen, inwieweit die abgepufferten Essigsäureionen Einfluß auf das Hämolysin haben, wurden für den Ausgangskontrollwert 10 ml 0.1 M Phosphatpuffer mit 10 µl Eisessig vermischt. Davon inkubiert man ein Aliquot von 1 ml zusammen mit dem gleichen Volumen PPH 10 Min. bei Raumtemperatur und verfährt dann wie oben angegeben.

Der Testansatz für die Negativkontrolle enthielt 1 ml PPS statt PPH bei sonst gleicher Zusammensetzung. Bei den Versuchen wird das PPH von Sv 5 so verdünnt, daß der Ansatz für die Ausgangskontrolle eine hämolytische Aktivität von etwa 200 HU/ml aufweist.

3.6 SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.6.1 Herstellung der Antigene

Hämolysin von L. monocytogenes Sv 5

Präparationen von PPH von Sv 5 (0.3 mg Protein/ml) wurden verwendet.

Formalin-inaktiviertes Hämolysin (FH)

PPH von Sv 5 (0.3 mg Protein/ml) wurde 24 Std. in 0.4% Formalinlösung (Endkonzentration) bei 37° C inaktiviert.

Vermehrungsfähige Keime von L. monocytogenes Sv 5, Stammnr. 2379

Die Keimmenge einer 5 ml-Tryptose-Phosphat-Bouillon-Kultur wurde nach 18 Std. Wachstum bei 37°C dreimal in PPS (pH 7.3) gewaschen. Für die Immunisierung enthielten die Keimsuspensionen etwa 2.5×10^8 bis 1.5×10^9 vermehrungsfähige Organismen pro ml PPS.

3.6.2 Herstellung der Antiseren

Drei Monate alte Kaninchen (New-Zealand-Rasse, 3-4 kg Körpermasse) wurden für die Gewinnung der Antiseren verwendet.
Vor Beginn der Immunisierung wurden die Tiere auf Antikörper gegen Hämolysin von Sv 5 untersucht. Diese Seren dienten dann auch als Kontrollen für einige Versuche.
Alle Seren wurden 30 Min. lang bei 56°C inaktiviert.

Gewinnung von Antiserum gegen Hämolysin von L.m. Sv 5

An den Tagen 0 und 7 wurden 0.5 ml bzw. 0.75 ml PPH von Sv 5 subcutan den Tieren gespritzt; zusätzlich wurden an denselben Tagen 0.5 ml bzw. 0.75 ml PPH mit dem gleichen Volumen kompletten Freundschen Adjuvants (Difco) vermischt, und die Suspension, in Einzeldosen von etwa 0.1 ml bis 0.2 ml verteilt, subcutan verabfolgt.
Am 14. Tag wurde außerdem 1 ml PPH i.m. injiziert.

Am 40. Tag verabfolgte man als Boosterimpfung 1 ml PPH subcutan.
14 Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen entblutet und nach Entfernung des Blutkuchens die gewonnenen Seren bei -20°C aufbewahrt.
Eine weitere Gruppe von Tieren wurde nach dem gleichen Injektionsschema mit FH immunisiert.

Gewinnung von Antiserum gegen vermehrungsfähige Keime von L.m. Sv 5

An den Tagen 0, 7, 14 und 16 wurden die Kaninchen mit jeweils 1 ml Keimsuspension gewachsener L.m. Sv 5 in die Ohrrandvene geimpft.
Am 40. Tag wurden die Tiere auf dieselbe Weise mit einer Boosterinjektion von 2 ml Suspension immunisiert.
Die Kaninchen ertrugen diese Lebendimpfungen sehr gut, ohne erkennbare Symptome einer systemischen Erkrankung.
14 Tage nach der letzten Injektion wurden die Versuchstiere entblutet und die gewonnenen Seren bei -20° aufbewahrt.

3.6.3 Quantitativer Antihämolysin-Neutralisationstest

Von den zuvor inaktivierten Testseren werden in separaten Reagenzröhrchen mit PPS (pH 6.7) verschiedene Ausgangsverdünnungen (1:50, 1:75 oder 1:125) hergestellt. Davon ausgehend präpariert man durch Überpipettieren in Reagenzröhrchen, in denen zuvor je 0.5 ml PPS vorgelegt wurde, eine geometrische Verdünnungsreihe der Testseren;

außerdem wird jeweils ein Röhrchen für eine Erythrozyten-, Hämolysin- und eine Serumkontrolle reserviert und entsprechend beschickt.
Als Gebrauchslysindosis wird die Konzentration des teilgereinigten Hämolysins gewählt, die unter den unten angegebenen Bedingungen bis zum Ende des Neutralisationstests in der Hämolysinkontrolle 90 % bis 95 % der Erythrozyten lysiert.
Erfahrungsgemäß muß die Hämolysinpräparation dazu eine hämolytische Aktivität von etwa 30 HU aufweisen.
In jedes Röhrchen mit 0.5 ml einer Serumverdünnungsstufe gibt man 0.5 ml der Hämolysinpräparation (in die Röhrchen für Erythrozyten- und Serumkontrolle wird je 0.5 ml PPS gefüllt).
Unter wiederholtem kurzen gründlichen Aufschütteln läßt man dann alle Röhrchen zunächst 10 Min. bei 37°C im Wasserbad, anschließend 25 Min. bei Raumtemperatur (ca. 23°C) stehen und zentrifugiert sie dann 5 Min. bei 1500 x g (4°C).
Wenn die Kontrollen vorschriftsmäßig reagiert haben, ermittelt man von jeder Verdünnungsreihe das letzte Röhrchen, das etwa eine 50 bis 70%ige Hämolyse aufweist. Die Serumverdünnung in diesem Röhrchen ist dann der Antihämolysin-Titer des Serums. In analoger Weise erfolgte die Austestung der Seren auf eventuell vorhandene Antikörper, die teilgereinigtes Hämolysin von Sv 3a oder das Hämolysin von B. cereus neutralisieren.

3.6.4 Qualitativer Test zur Neutralisierung der Hämolyse auf Blutagar durch Antihämolysin

Mit dem ausgeglühten Mundstück einer Pasteurpipette werden in Schafblutagar 2 Löcher ausgestanzt. Die Löcher füllt man anschließend dreimal randvoll mit Antihämolysin und läßt jede Portion etwa 4 Stunden bei Zimmertemperatur in den Agar diffundieren.

Auf diese Weise werden in jedes Loch insgesamt etwa 0.2 ml Antiserum gegeben.

Anschließend streicht man hämolytische Stämme von L. m. Sv 3a und Sv 5 rings um die Löcher aus; nach zweitägiger Bebrütung werden die Blutagarplatten auf etwaige Hemmzonen der Hämolyse überprüft.

Eine eventuelle Hemmung der lipolytischen Aktivität der Listeria-Stämme durch Antihämolysin wurde in ähnlicher Weise auf Eigelbagar untersucht. Die ausgestanzten Löcher hatten dabei eine Tiefe von 7 mm; von jedem Loch diffundierte insgesamt etwa 0.3 ml Antiserum in den Agar.

3.6.5 Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay-(ELISA) zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Hämolysin von L.m. Sv 3a und Sv 5

Als Antigene kamen PPH von L.m. Sv 3a und Sv 5 sowie das Hämolysin von B.cereus in einer Konzentration von 10 µg Protein/ml 0.05 M Carbonat-Puffer (pH 9.6) zur Verwendung.
Zum Waschen diente PPS (pH 7.3) mit 0.02 % (G/V) NaN_3 und 0.05 % (V/V) Tween 20 Zusatz (PPS-T). Mit dieser Lösung wurden außerdem die Verdünnungen der Testseren sowie des Enzymkonjugats hergestellt. Letzteres war die an das Enzym Alkalische Phosphatase-Typ VIII konjungierte IgG-Fraktion von Anti-Kaninchen-Immunglobulin der Ziege. Dieses Enzymkonjugat (Miles Ltd., Israel) wurde 1:1000 verdünnt. Substrat für den Enzymansatz war eine 0.1 % (G/V) Lösung von p-Nitrophenylphosphat in 10 % (V/V) Diäthanolamin-Puffer (pH 9.8).
Abgesehen von mehreren Abänderungen lehnte sich die Ausführung des ELISA auf besonders präparierten Mikrotiterplatten (Dynatech) der Methode von ENGVALL/PERLMANN (1972) an.

Zur Beschichtung mit Antigen wird in jede Vertiefung der Platte 0.1 ml Hämolysinlösung gegeben. Nach 2 Std. Bebrütung bei 37°C entfernt man den Überstand durch Ausschütteln und wäscht die nunmehr beschichteten Näpfchen dreimal für jeweils 3 Min. mit PPS-T (Mikroshaker, Dynatech).

Die Vertiefungen werden mit 0.1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe des Testserums beschickt und die so aufgeschüttelten Mikrotiterplatten 2 1/2 Std. bei 37°C bebrütet (Antigen-Antikörperbindung an der Näpfchenwand, die als feste Phase dient). Danach schüttelt man die Testseren aus und wäscht erneut dreimal (Entfernung unspezifisch absorbierter Substanzen).

Pro Näpfchen werden 0.1 ml des vorverdünnten Anti-IgG-Kaninchen-Enzymkonjugats zugesetzt und die Platte 1 Stunde lang in einer feuchten Kammer bei 37°C bebrütet.

Nach erneutem dreimaligen Waschvorgang fügt man 0.2 ml-Aliquots der Substratlösung zu und läßt nach gründlichem Mischen (Mikroshaker®, Dynatech) die enzymatische Reaktion 30 Min. bei Zimmertemperatur ablaufen. Dann wird durch Zugabe von jeweils 25 µl 4 N NaOH die Reaktion gestoppt und dieExtinktion des entstandenen gelben Farbstoffes photometrisch bei 405 nm bestimmt. Die gelbe Farbe der enzymatisch umgesetzten Substratlösung resultiert aus der an die feste Phase absorbierten Aktivität des Enzymkonjugats. Dabei ergab sich bei einer o.D. im Bereich von 0.3 bis 0.7 eine lineare Abhängigkeit zwischen der Serumverdünnung und der Enzymaktivität und damit der Menge spezifisch gebundener Anti-IgG-Globuline.

Der IgG-Antihämolysin-Titer eines Testserums wurde dann nach dem

Näpfchen bewertet, das im IgG-ELISA in der höchsten Serumverdünnungsstufe eine Extinktion im Bereich von 0.45 bis 0.55 aufwies.

3.6.6 Anti-Streptolysin O-Neutralisationstest und Anti-α-Staphylolysin-Neutralisationstest

Die Ausführung des Anti-Streptolysin O-Neutralisationstestes und des Anti-α-Staphylolysin-Neutralisationstestes erfolgte im Mikroverfahren nach den Richtlinien des Herstellers (Behringwerke, Marburg).

3.6.7 O-Agglutinations-Röhrchentest

Der O-Agglutinations-Röhrchentest wurde nach der Methode von SEELIGER (1961) durchgeführt.

3.6.8 Immunodiffusionstest

Die Immunodiffusion folgte im wesentlichen der von OUCHTERLONY (1962) beschriebenen Methode des Agar-Diffussionstestes mit einigen Modifikationen (GARVEY et al. 1977).
Dazu wird auf Glasplatten eine 2-3 mm dicke Gelschicht (1% Agarose L (Behringwerke, Marburg) in 0.02 M 5,5-Diäthylbarbiturat-Acetat-Puffer gegossen.
Nach dem Erstarren gibt man in die ausgestanzten Löcher Präparationen von Hämolysin und Antiserum in verschiedenen Verdünnungen und läßt die Platten 5 Tage in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur stehen. Danach erfolgt die Ablesung auf etwaige Präzipitationslinien.

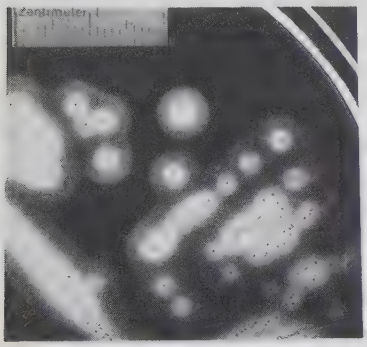
4. ERGEBNISSE

4.1 KULTURELLES VERHALTEN VON L.m. Sv 5 AUF BLUT- UND EIGELBAGAR

4.1.1 Hämolytische Aktivität auf Schafblutagar

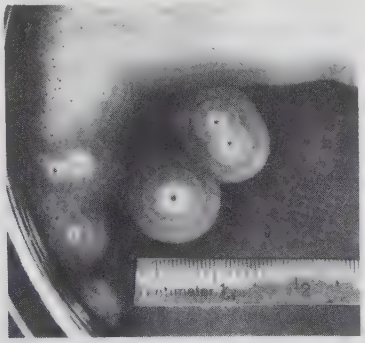
Innerhalb von 36 Std. Wachstum auf Schafblutagar bei 37°C wurde um die Kolonien von L. monocytogenes Sv 5 eine ß-Hämolyse (1-2.5 mm ∅) sichtbar, die von einem dunklen Ring umgeben war. Dieser entwickelte sich nach wenigstens einem Tag zu einer Zone unvollständiger Hämolyse, welche die ß-Lysezone konzentrisch umschloß (Abb. 1a).

Abb. 1a



"Doppelzonenhämolyse" von L.m. Sv 5 (SLCC Nr. 3769) nach 72 Std. Wachstum auf Schafblutagar.

Abb. 1b



"Mehrfachzonenhämolyse" von L.m. Sv 5 (SLCC Nr. 3765) nach 96 Std. Wachstum auf Schafblutagar.

Dieses Phänomen der sogenannten "Doppelzonenhämolyse" kam nicht so klar abgegrenzt zum Ausdruck, wenn das Schafblut vor der Zugabe zum Agarbasismedium nicht gewaschen wurde.
Ließ man die Kulturen länger als 3 Tage wachsen, wiesen einige Stämme mehrere konzentrische Zonen solcher unvollständigen Hämolyse auf (Abb. 1b).

4.1.2 Lipolytische Aktivität auf Eigelbagar

52 von 57 untersuchten Sv 5-Stämmen wiesen eine positive Lezithinase-Reaktion auf Eigelbagar auf. Die Methoden nach Mc CLUNG/TOABE (1947) und WILLIS (1958) brachten bei 2 Stämmen voneinander abweichende Befunde.

4.2 GEWINNUNG UND REINIGUNG DES HÄMOLYSINS

4.2.1 Hämolysinausscheidung während des Wachstums von L. m. Sv 5

Die Hämolysinausscheidung während des Wachstums von vier Sv 5-Stämmen (SLCC Nr. 2098, Nr. 2379, Nr. 3769, Nr. 4729) wurde untersucht, um den besten Zeitpunkt und die optimalen Bedingungen für die Hämolysinherstellung in größerem Umfang festzulegen. Dabei ergab sich eine direkte Beziehung zwischen Bakterienwachstum und Hämolysinausscheidung (Abb. 2). Die Kultivierung unter Ruhebedingungen resultierte in weniger Wachstum, dafür aber geringfügig höheren Hämolysintitern.
In Schüttel- und Ruhekulturen, die bei 37°C in BHI-Bouillon angezüchtet wurden, erreichte die hämolytische Aktivität ihren ersten Höhepunkt nach 7 bis 8stündiger Bebrütung am Ende der exponentiellen Wachstumsphase.

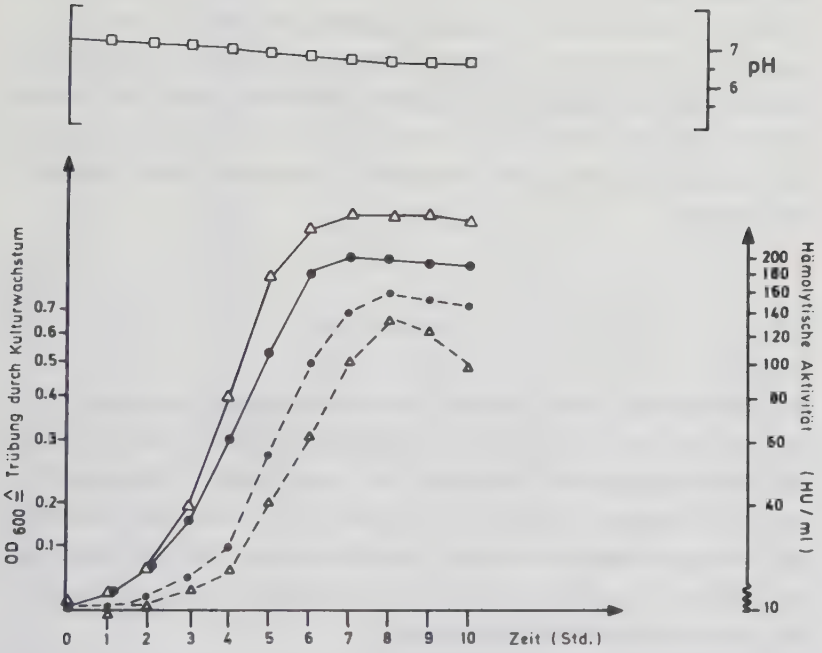


Abb. 2 Hämolysinausscheidung von L.monocytogenes Serovar 5, Stamm Nr. 2379 (IVANOV) während des Wachstums in BHI - Bouillon bei 37° C.

△——△ Wachstum in der Schüttelkultur
●——● Wachstum in der Ruhekultur
△- - -△ Hämolytische Aktivität im zellfreien Überstand der Schüttelkultur
●- - -● Hämolytische Aktivität im zellfreien Überstand der Ruhekultur

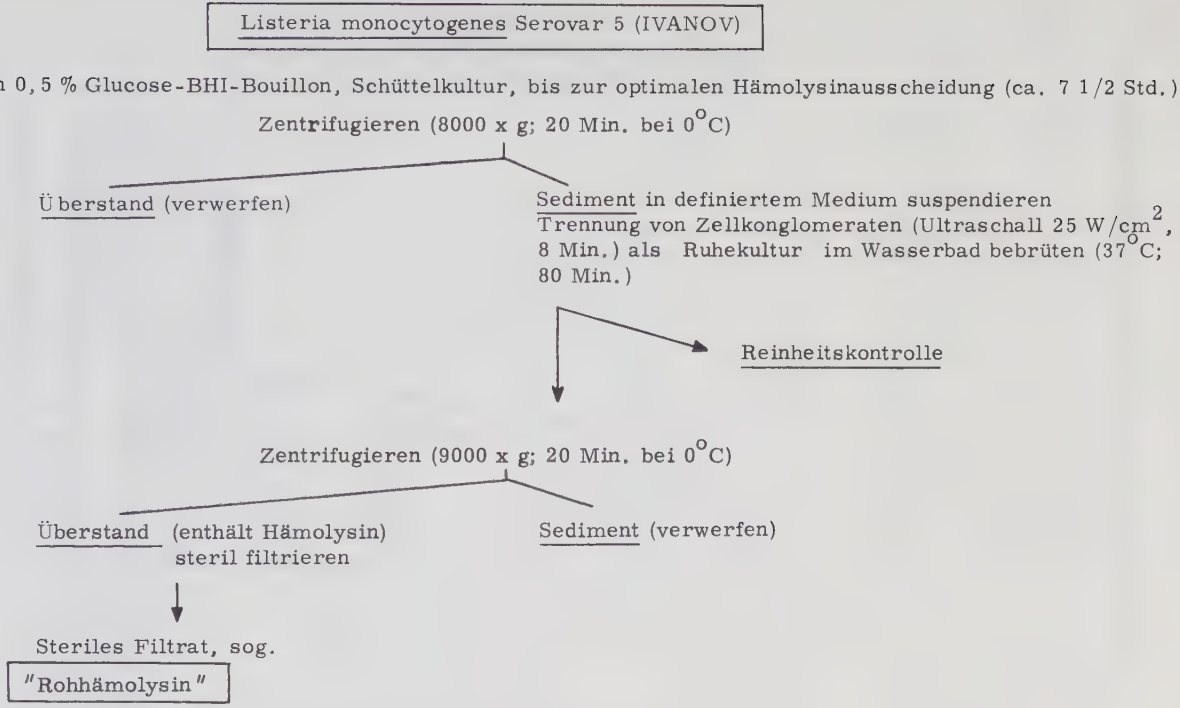
4.2.2 Herstellung des Rohhämolysins

Auf dem Höhepunkt der Hämolysinausscheidung wurden die Bakterienzellen, die in einem Vollmedium gewachsen waren, durch Zentrifugieren "gewonnen" und dann zur Ausscheidung ihres Hämolysins in ein chemisch definiertes Medium gegeben (Übersicht 2). Dieses Vorgehen ermöglichte die Gewinnung eines hochtitrigen "Rohhämolysins" (spezifische Aktivität ungefähr 250 HU/mg Protein), das von den Bakterien in sehr kurzer Zeit abgegeben wurde und nur wenig kontaminierende Bestandteile enthielt.

4.2.3 Reinigung des Hämolysins

Das Rohhämolysin wurde zunächst durch Ammoniumsulfatfällung konzentriert und teilweise gereinigt. Als Endkonzentration des zugegebenen Ammoniumsulfats ergab sich etwa 70 %. Entsalzung und Pufferwechsel konnten auf kleinen mit Sephadex G 25 oder G 50 medium gepackten Säulen in wenigen Minuten erfolgen; wegen der leichten Denaturierbarkeit des Hämolysins stellte sich darum diese Methode im Vergleich zur Dialyse als besonders günstig heraus.
Letzter Reinigungsschritt war eine Gelfiltration auf einer Biogel P 200 - Säule. Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, insbesondere für die Immunisierung, ist dieser Reinheitsgrad des Hämolysins ausreichend.
Die isoelektrische Fokussierung erwies sich als präparativer Reinigungsschritt ungeeignet; die Ausbeute betrug weniger als 1 %.

Übersicht 2



Präparation des "Rohhämolysins" von Listeria monocytogenes Serovar 5

4.3 PHYSICO-BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DES HÄMOLYSINS VON L.m. Sv 5

4.3.1 Isoelektrischer Punkt

Bei der isoelektrischen Fokussierung ergab sich für das Hämolysin von L.m. Sv 5 ein isoelektrischer Punkt (pI) von 4.8 ± 0,1 (Abb. 3).

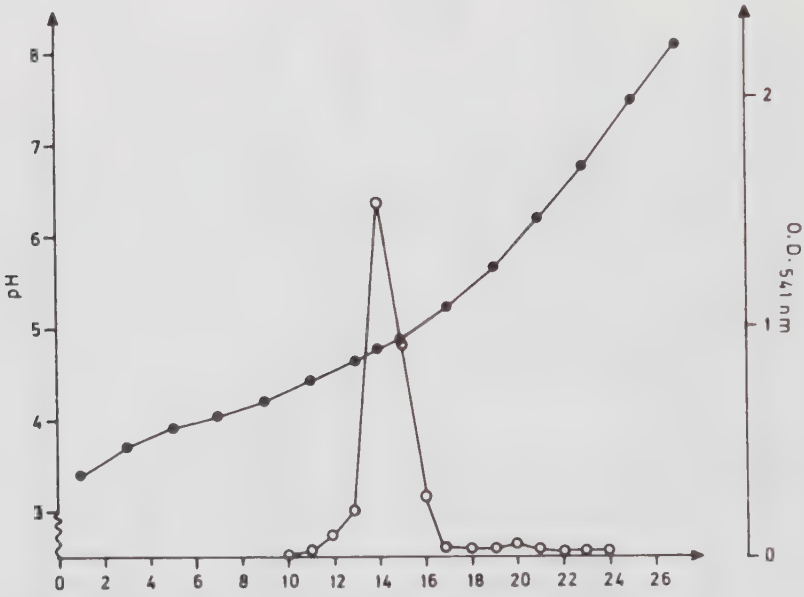


Abb. 3

Verteilung des Hämolysins von L.m. Serovar 5 bei der isoelektrischen Fokussierung

Für das Hämolysin ergibt sich ein isoelektrischer Punkt (pI) ≈ 4,8 .

●——● pH - Werte (gemessen bei ≈ 10°C)

o——o O.D.$_{541}$ (≙ durch Hämolyse freigesetztes Hämoglobin)

4.3.2 Molekulargewicht des Hämolysins

Aus der Geraden, die man durch Auftragen des Logarithmus der Molekulargewichte der Standardproteine gegen die Werte ihrer Elutionsvolumina erhält, ergibt sich für das Hämolysin ein Molekulargewicht von etwa 67 000 (Abb. 4).

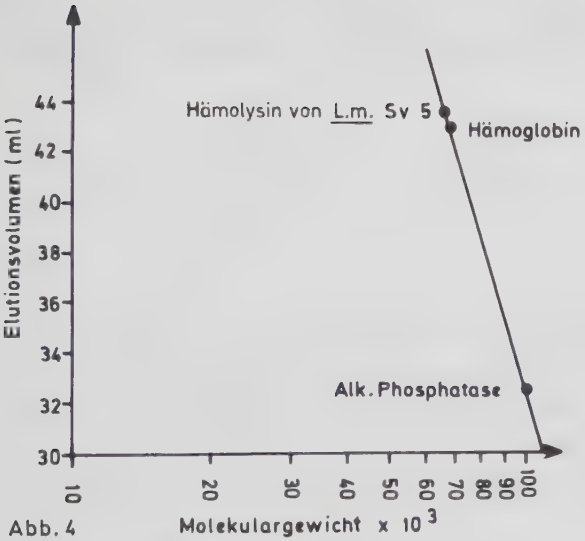


Abb. 4

Bestimmung des Molekulargewichtes des Hämolysins von L.m. Serovar 5 durch Gelfiltration.
Markerproteine: Pferdehämoglobin (MG 68 000);
Alkalische Phosphatase (MG 100 000).
Für das Hämolysin ergibt sich ein MG ≈ 67 000.

4.3.3 Wirkung von reduzierenden Substanzen auf das Hämolysin von L. m. Sv 5

Die reduzierenden Substanzen L-Cystein und $Na_2S_2O_4$ konnten in den angegebenen Konzentrationen die hämolytische Aktivität von L. m. Sv 5 (SLCC Nr. 2379) nicht signifikant erhöhen.
Lediglich in einem von 10 Testansätzen wurde eine Steigerung der Aktivität um etwa 20 % beobachtet.
Dagegen wurde in der Hämolysinpräparation von Sv 4a (SLCC Nr. 2374), die gleichsam als "Positivkontrolle" mitgeführt wurde, die hämolytische Aktivität durch 10^{-3} M $Na_2S_2O_4$ um das 4fache, durch $5x10^{-2}$ M Cystein um etwa das 6fach gegenüber der Ausgangsaktivität potenziert.

4.3.4 Verhalten des Hämolysins bei verschiedenen Temperaturen

Hämolysin von L.m. Sv 5 wurde mit steigender Temperatur rasch inaktiviert und erwies sich damit als hitzelabil (Abb. 5).

Abb. 5

Verhalten des Hämolysins von L. monocytogenes Serovar 5 bei verschiedenen Temperaturen

Dauer der Temperatur-einwirkung	Temperatur	Hämolytische Aktivität (% der zuvor getesteten Aktivität)
4 Min.	56° C	0 %
20 Min.	37° C	50 %
> 1 Monat	-20° C	100 %

Für einige Hämolysine, wie für das ß-Hämolysin von S. aureus oder das α-Toxin von C. perfringens, ist eine sog. "Hot-Cold"-Reaktion charakteristisch, d.h. eine Potenzierung der Hämolyse bei tiefen Temperaturen (ca. 4°C) im Anschluß an eine Inkubationsperiode bei 37°C. Eine solche "Hot-Cold"-Lyse wurde beim Hämolysin von L.m. Sv 5 nicht beobachtet.

4.3.5 Wirkung von Trypsin und Pronase auf das Hämolysin

Hämolysin von Sv 5 erwies sich als äußerst empfindlich gegenüber den proteolytischen Enzymen Trypsin und Pronase.
Unter der Einwirkung von Trypsin (0.2 mg/ml) und Pronase (0.25 mg/ml)

verlor das Hämolysin seine hämolytische Aktivität vollständig, im Gegensatz zu seiner Aktivität von etwa 460 HU/ml in den Kontrollversuchen.

4.3.6 Wirkung von Cholesterin auf das Hämolysin

Cholesterin zeigte eine hemmende Wirkung gegenüber dem Hämolysin. Bereits 250 pMol Cholesterin im Testansatz genügten, um nur noch 40% der Ausgangsaktivität des Hämolysins zu erhalten. Nach Zugabe der doppelten Konzentration von Cholesterin ergaben sich nur noch etwa 10% der Aktivität der Ausgangskontrollprobe.

4.3.7 Aktivität des Hämolysins gegenüber Erythrozyten unterschiedlicher Spezies

Das Hämolysin von L. m. Sv 5 konnte die Erythrozyten verschiedenster Spezies auflösen (Abb. 6); rote Blutkörperchen vom Pferd und Affen zeigten dabei die größte Empfindlichkeit.

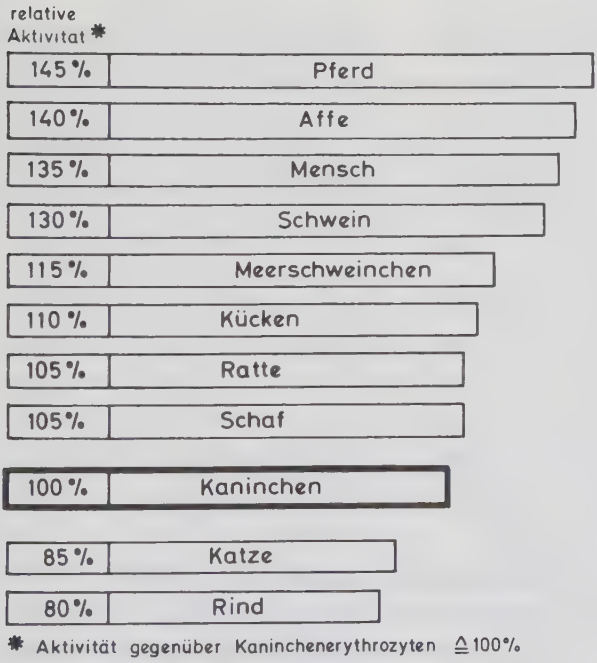


Abb. 6

Aktivität des Hämolysins von L. monocytogenes Serovar 5 gegenüber Erythrozyten verschiedener Spezies.

4.4 ERGEBNISSE DER SEROLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN

Übersicht 3

Titer von Antiseren gegen teilweise gereinigtes Hämolysin und vermehrungsfähige Keime von L. monocytogenes Serovar 5 im Test mit verschiedenen Antigenpräparationen

Testmethode	Neutralisation	ELISA-IgG	Neutralisation	ELISA-IgG	O-Agglutination	Neutralisation			ELISA-IgG
Antigen / Antiserum gegen	PPH – Sv 5		PPH – Sv 3a		O-Antigen Sv 5	Streptolysin O	α-Staphylolysin	Hly B.cereus	
PPH – Sv 5	1:5000	1:32 000	1:4000	1:8000	1:100	< 1:50	< 1:1,5	1:200	1:50
FH – Sv 5	1:5000	1:32 000	1:4000	1:8000	1:100	< 1:50	< 1:1,5	1:200	1:50
vermehrungsfähige Keime von L.m. Sv 5	1:2000	1:12500	1:1600	n.g.	1:1600	< 1:50	< 1:1,5	n.g.	n.g.
Serum vor Immunisierung	1:200	1:80	1:300	1:10	1:100	< 1:50	< 1:1,5	1:50	1:10

n.g. = nicht geprüft

4.4.1 Antigenetische Wirkung des Hämolysins im Reihenverdünnungstest

Kaninchen, die mit PPH und FH von Sv 5 immunisiert wurden, antworteten mit der Bildung von Antikörpern, die das Hämolysin im Reihenverdünnungstest neutralisieren (Übersicht 3, vorhergehende Seite).

Quantitativer Antihämolysin-Neutralisationstest

Antihämolysin-Serum konnte in einer Verdünnung von mindestens 1:5000 PPH von Sv 5 mit einer Aktivität von 30 HU/ml neutralisieren. Die Immunisierung mit FH ergab ebenso hohe Titer. Seren, die vor der Immunisierung abgenommen werden, wiesen dagegen einen Antihämolysin-Titer von höchstens 1:200 auf.
Antiserum gegen vermehrungsfähige Keime enthielt antihämolytische Aktivität in einer Verdünnung bis zu 1:2000.
Antiserum gegen PPH von Sv 5 konnte auch PPH von Sv 3a hemmen: der Titer neutralisierender Antikörper betrug dabei 1:4000. Eine signifikante hemmende Wirkung gegenüber Streptolysin 0, α-Staphylolysin und dem Hämolysin von B. cereus wies dieses Antihämolysin dagegen nicht auf.

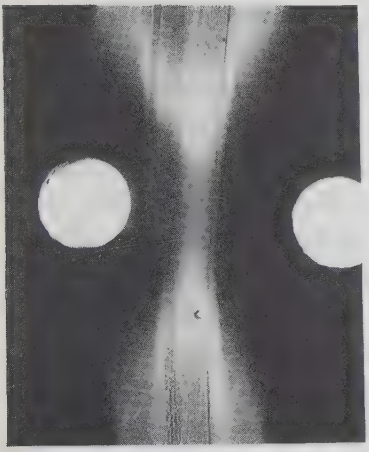
Mit Hilfe des IgG-ELISA konnten ferner IgG-Antikörper gegen Hämolysin von L.m. Sv 5 bei damit immunisierten Kaninchen nachgewiesen werden. Testseren, die man durch Immunisierung mit PPH und FH gewonnen hatte, wiesen dabei IgG-Antihämolysin Titer bis zu 1:32000 auf; im Serum von Kaninchen, die mit gewaschenen lebenden Keimen von Sv 5 geimpft wurden, betrug der Titer maximal 1:12500; im Serum vor der Immunisierung 1:80. Außerdem konnten im Anti-Sv 5-Hämolysin IgG-Antikörper gegen PPH von Sv 3a festgestellt werden; jedoch nicht gegen Streptolysin 0; α -Staphylosysin und dem Hämolysin von B. cereus.

Im 0-Agglutinations-Röhrchentest
zeigte Antiserum gegen PPH und FH von Sv 5 keinen nennenswerten Titer gegen 0-Antigen von Sv 5. Antiserum gegen vermehrungsfähige Keime von Sv 5 agglutinierte dagegen das 0-Antigen derselben Sv in einer Verdünnung von 1:1600.

4.4.2 Qualitativer Test zur Neutralisierung der Hämolyse auf Blutagar durch Antihämolysin

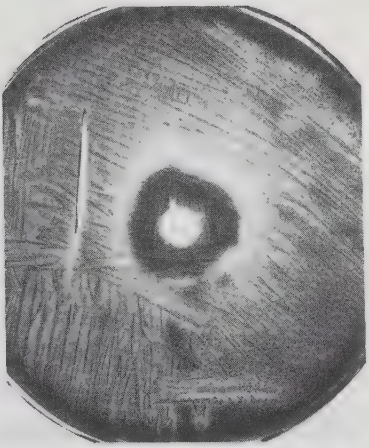
Antiserum gegen PPH von Sv 5 konnte auch die Hämolyse von Sv 5-Stämmen auf Blutagar hemmen.
Obwohl die ausgestrichenen Stämme bis an den Rand der zuvor mit Antihämolysin gefüllten Stanzlöcher wuchsen, wurde nach zweitägiger Bebrütung eine um die Löcher konzentrische Hemmzone der Hämolyse sichtbar (Abb. 7a).
Ließ man Antiseren gegen FH oder vermehrungsfähige Organismen von Sv 5 in den Agar diffundieren, ergab sich ebenfalls dieses Phänomen der Neutralisierung der Hämolyse.
Anti-PPH-Sv 5-Serum konnte ferner in der beschriebenen Weise die Hämolyse von Sv 3a hemmen (Abb. 7b).
Darüber hinaus wurde eine Neutralisierung der Lezithinase-Aktivität von Serovar 5-Stämmen auf Eigelbagar durch das Antihämolysin beobachtet.

Abb. 7a



Neutralisierung der Hämolyse von L.m. Sv 5 (SLCC Nr. 2379) durch Antiserum gegen Sv5-Hämolysin

Abb. 7b



Neutralisierung der Hämolyse von L.m. Sv 3a (SLCC Nr. 2373) durch Antiserum gegen Sv 5-Hämolysin

4.4.3 Homogenitätstest durch Immunodiffusion

Die Diffusion von "Rohhämolysin" von Sv 5 gegen Anti-"Rohhämolysin" von Sv 5 ergab zwei oder drei Präzipitationslinien. Ließ man PPH von Sv 5 gegen das gleiche Antiserum diffundieren, war nur eine Linie sichtbar, ebenso bei der Diffusion von PPH gegen Anti-PPH-Sv5-Serum. Somit dürfte das PPH von Sv 5 eine homogene Antigenzubereitung darstellen.

5. DISKUSSION

Die sogenannte Doppelzonenhämolyse von L. monocytogenes Sv 5 bei Wachstum auf Schaf- oder Pferdeblutagar wurde bisher bei keiner anderen Serovar von L.m. beobachtet (COOPER et al. 1973 a; HUNTER 1973) und ist somit offenbar für die Sv 5 typisch. Die weniger klar abgegrenzten Hämolysezonen von Sv 5-Stämmen bei Wachstum auf Blutagar mit ungewaschenem Blut sind möglicherweise auf unspezifisch hemmende Substanzen im Serum (Proteasen, ß-Lipoproteine) zurückzuführen. Zu diesem Merkmal der "Doppelzonenhämolyse" kommt als weiteres für Sv 5-Stämme charakteristisches Phänomen die Steigerung der Hämolyse bei gleichzeitigem Wachstum in Gegenwart von Rhodococcus equi (früher: Corynebacterium equi; FRASER 1962; HUNTER 1973). Ein positiver Befund in diesem modifizierten CAMP-Test mit R. equi hat inzwischen als wichtiges differentialdiagnostisches Kriterium zur Identifizierung von L.m. Sv 5 Eingang gefunden (SEELIGER/SCHRETTENBRUNNER/ROCOURT 1981).
Die Hämolysefähigkeit von Sv 5-Stämmen beruht auf einem löslichen, filtrierbaren Hämolysin. Das frühe Erscheinen des Hämolysins während der exponentiellen Wachstumsphase und der Höhepunkt der Exkretion am Ende dieser Phase lassen auf einen extrazellulären Charakter des Hämolysins schließen.

Die Bildung des Hämolysins ist dabei auch im chemisch definierten Medium möglich, was sich für die Reinigung des Hämolysins als günstig erweist.
Die geringere hämolytische Aktivität in den Überständen von Schüttelkulturen dürfte in der Sauerstofflabilität des Hämolysins begründet liegen. Dies deckt sich auch mit den Befunden über das Hämolysin von Listeria-Stämmen, die nicht der Sv 5 angehören (GIRARD et al. 1963; LEMELAND et al. 1974).

Thermolabilität sowie die Empfindlichkeit gegenüber den proteolytischen Enzymen Trypsin und Pronase unterstreichen den Proteincharakter des Hämolysins. Dieses Protein erwies sich als sehr wirkungsvolles Antigen zur Stimulation von Antikörpern, welche die hämolytische Aktivität in verschiedenen Reihenverdünnungstesten und auch auf Blutagar neutralisieren konnten. Formalin-inaktiviertes PPH von Sv 5 hatte als Antigen den gleichen Effekt. Offenbar hängt die Antigenicität des Hämolysins nicht mit seiner hämolytischen Aktivität, sondern mit seiner Struktur als Protein per se zusammen. Eine solche hyperimunogene Eigenschaft von denaturierten Proteinen ist auch von Hämolysinen anderer Bakterienspezies wie etwa vom α-Staphylolysin (BURNET 1931; ARBUTHNOTT et al. 1973) oder von den Toxoiden in der Impfstoffherstellung bekannt. Von allen bisher untersuchten Hämolysinen von L. monocytogenes liegen bisher keine Angaben über den isoelektrischen Punkt (pI) vor.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ergaben für das Hämolysin von Sv 5 ein pI $\pm$ 4,8.

Der Wert des Molekulargewichtes des Hämolysins von Sv 5 sowie seine Hemmbarkeit durch Cholesterin lassen daran denken, daß dieses Hämolysin zur Gruppe der "SH-Gruppen-aktivierten Cytolysine" gehört, in die auch schon die Hämolysine der übrigen Serovare von L. monocytogenes zusammen mit Streptolysin 0, Θ-Toxin von C. perfringens und Cereolysin von B. cereus von DUNCAN und SMITH 1978 eingeordnet wurden (SMITH/DUNCAN 1978). Das entscheidende Kriterium für eine solche Zuordnung, nämlich die Aktivierung der hämolytischen Wirkung durch SH-Gruppen-haltige Substanzen konnte jedoch in den Versuchen für das Hämolysin von Sv 5 nicht in der erforderlichen Stärke nachgewiesen werden. Eine Zuordnung dieses Hämolysins zu dieser Toxingruppe der "SH-Gruppen-aktivierten Cytolysine" erscheint deshalb nach dem gegenwärtigen Stand der Forschungen nicht oder noch nicht gerechtfertigt.
Eine solche Gruppenzugehörigkeit des Hämolysins von Sv 5 würde im übrigen auch die Frage nach einer näheren Antigenverwandtschaft unter

einzelnen Hämolysinen dieser Gruppe aufwerfen. Bekanntlich haben Antiseren gegen gewisse Hämolysine dieser Gruppe die Eigenschaft, wiederum andere zu dieser Gruppe gehörige Hämolysine zu neutralisieren (JENKINS et al. 1964; SHANY et al. 1973; BERNHEIMER 1976). Anti-Sv 5-Hämolysin-Serum konnte in den eigenen Versuchen jedoch die hämolytische Wirkung weder von Streptolysin O noch vom Hämolysin von B. cereus aufheben.

Gegenüber dem Hämolysin stark hämolysierenden Referenzstammes der Sv 3a von L. monocytogenes konnte jedoch eine solche Kreuzneutralisierung durch Anti-Sv 5-Hämolysin im Reihenverdünnungstest und auf Blutagar beobachtet werden.

Weitere Aufschlüsse in der Frage einer möglichen Antigenverwandtschaft des Sv 5-Hämolysins mit der Gruppe der "SH-Gruppen-aktivierten Cytolysine" dürften die derzeit in Zusammenarbeit mit dem Institut für Genetik und Mikrobiologie laufenden Untersuchungen mit der Immunodiffusion und Immunelektrophorese bringen.

Das α-Toxin von S. aureus besitzt völlig andere physico-chemische Eigenschaften als das Hämolysin von Sv 5. Erwartungsgemäß wies das Anti-PPH-Sv 5-Serum im Anti- α-Staphylolysin-Neutralisierungstest keinen signifikanten Titer auf.

Die unterschiedliche Empfindlichkeit von Erythrozyten verschiedener Spezies dürfte auf die andersartige Phospholipidzusammensetzung der Zellmembran der jeweiligen Spezies zurückzuführen sein. 1961 brachte SEELIGER die ß-Hämolyse von Listeria-Stämmen, die nicht zur Sv 5 gehörten, mit ihrer Fähigkeit zur positiven Reaktion auf Eigelbagar in Verbindung und deutete das Hämolysin dieser Stämme als Phospholipase (SEELIGER 1961). Weitergehende Studien offenbarten dann im Hämolysin dieser Serovare eine lipolytisch aktive Fraktion (FUZI/PILLIS

1962; GIRARD et al. 1963; JENKINS et al. 1964; KHAN et al. 1973), die in der Ionen-Austausch-Chromatographie abgetrennt werden konnte (JENKINS/WATSON 1971; SIDDIQUE et al. 1974). Die eigenen Studien zeigten bei 52 von 57 untersuchten Sv 5 Stämmen eine positive Lezithinase-Reaktion; dagegen wiesen alle 23 der untersuchten nicht hämolysierenden Stämme der neuen Spezies Listeria innocua (SEELIGER/SCHOOFS 1977, cit. 1979) ein negatives Verhalten auf Eigelbagar auf (SCHRETTENBRUNNER 1981, persönliche Mitteilung). Von diesen Befunden und den oben dargestellten Zusammenhängen her sollte auch das Hämolysin von Sv 5 noch genauer dem Aspekt einer lipolytischen Aktivität untersucht werden.

Dabei ist nach wie vor unklar, welche Rolle dem Hämolysin von Listeria monocytogenes in der Pathogenese der Listeria-Infektion überhaupt zukommt. Immerhin gibt in den eigenen Versuchen der Anstieg des Antihämolysintiters bei Kaninchen nach Infektion mit hoher Keimzahl von Sv 5 zumindest Hinweise auf die Freisetzung von Hämolysin während einer Infektion.

Die bisher untersuchten Hämolysine von Listeria-Stämmen, die nicht der Sv 5 angehörten, wiesen zwar bei in vivo-Untersuchungen verschiedene pathophysiologische Wirkungen auf (SIDDIQUE/COOPER 1969; JENKINS/WATSON 1969; SWORD/KINGDON 1971; WIGGINS et al. 1974) und hatten auch cytotoxische Eigenschaften gegenüber verschiedenen Zellsystemen erkennen lassen (NJOKU-OBI et al. 1963; SIDDIQUE 1969; LEMELAND et al. 1974). Die in dieser Hinsicht aber bedeutungsvolle Untersuchung über die Wirkung des Hämolysins auf den Makrophagen, einem wichtigen Träger der Abwehr der Listeriose (HAHN 1974), steht bislang noch aus.

Im übrigen gilt die Fähigkeit eines Listeria-Stammes zur ß-Hämolyse im allgemeinen als ein Kriterium für seine Virulenz, worauf in neueren Studien auch immer wieder hingewiesen wird (EMOEDY/RALOVICH 1975;

ORTEL 1975). Hämolysierende Stämme der Serovare 1/2a; 4a und 4b waren dabei nach intraperitonealer Infektion pathogen für Mäuse, pathogen für Kückenembryos und verursachten Keratokonjunktivitis. Dieser Zusammenhang ist im Hinblick auf die Sv 5 umso interessanter, als die Stämme dieser Sv zwar eine ausgeprägte Hämolyse zeigen, dafür aber insgesamt eine relativ geringgradige Virulenz aufweisen (HOF 1981, persönliche Mitteilung).

Die Serovarietät 5 besitzt somit unter den Serovaren von L. monocytogenes in den biochemischen und serologischen Eigenschaften (SEELIGER/SCHRETTENBRUNNER/ROCOURT 1981), in der Pathogenität, wie auch im Hämolyseverhalten eine Sonderstellung, was wiederum die Frage nach einer taxonomischen Abgrenzung von Sv 5 als neue Subspezies oder gar Spezies aufwirft.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Stämme der Serovarietät 5 von L. monocytogenes ragen neben anderen Eigenschaften besonders durch ihre ausgeprägte und charakteristische Hämolyse hervor. Diese manifestiert sich unter anderem auf Agar mit gewaschenem Schafblut typischerweise in Form einer sog. Doppelzonenhämolyse; dazu kommt als weiteres Hämolysephänomen das positive Verhalten im modifizierten Camp-Test mit Rhodococcus equi.

Die Hämolysefähigkeit von Sv 5-Stämmen beruht auf einem löslichen filtrierbaren Hämolysin.

Die Korrelation zwischen Hämolyse und positiver Lezithinase-Reaktion von Sv 5 bedarf weiterer Abklärung.

In Schüttel- und Ruhekulturen, die bei 37°C in BHI-Bouillon angezüchtet wurden, erreicht die Hämolysinausscheidung ihren ersten Höhepunkt nach 7 bis 8stündiger Bebrütung am Ende der exponentiellen Wachstumsphase.

Auf dem Höhepunkt der Hämolysinexkretion wurden die im Nährsubstrat (Vollmedium) herangewachsenen Bakterienzellen durch Zentrifugieren gewonnen und dann zur Ausscheidung ihres Hämolysins für etwa 80 Min. in ein chemisch definiertes Medium gegeben.

Das so gebildete Rohhämolysin wurde durch Ammoniumsulfatfällung mit nachfolgender Entsalzung sowie durch Gelfiltration teilweise gereinigt.

Das Hämolysin von Sv 5 erweist sich als hitzelabiles, durch Cholesterin hemmbares Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 67 000 und einem isoelektrischen Punkt von ± 4.8. Gegenüber Erythrozyten verschiedener Spezies bietet es ein breites lytisches Spektrum, wobei die

Erythrozyten vom Pferd und Menschen am empfindlichsten sind.

Eine signifikante Steigerung der hämolytischen Aktivität durch reduzierende Substanzen wurde nicht beobachtet.

Kaninchen, die mit teilweise gereinigtem Hämolysin von Sv 5 immunisiert wurden, bilden Antikörper, die im Reihenverdünnungstest und auf Schafblutagar die hämolytische Aktivität neutralisieren. Formalininaktiviertes Hämolysin ist dabei als Antigen ebenso wirksam.

Antiserum gegen PPH von Sv 5 hemmt auch die ausgeprägte hämolytische Aktivität von PPH der Sv 3a, nicht jedoch die von B. cereus, Streptolysin 0 und α-Staphylolysin.

Die Serovarietät 5 weist damit auch hinsichtlich ihrer Hämolyseeigenschaften unter den Serovaren von L. monocytogenes eine Sonderstellung auf, wodurch sich die Frage nach einer weitergehenden taxonomischen Abgrenzung stellt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ANDREWS, P. — The gelfiltration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range. Biochem. J. 96, 595 - 606 (1965).

ARBUTHNOTT, J., FREER, J., Mc NIVEN, A. — Physical properties of staphylococcal alpha-toxin and aspects of alpha-toxin membrane interactions. Contrib. Microbiol. Immun. 1, 285 - 297 (1973).

BERNHEIMER, A.W. — Mechanisms in bacterial toxinology, John Wiley and Sons, New York 1976.

BURN, C.G. — Characteristics of a new species of the genus Listerella obtained from human sources. J. Bact. 30, 573 - 591 (1935).

BURNET, F.M. — The interactions of staphylococcal toxin anatoxin and antitoxin. J. Path. Bact. 34, 471 - 492 (1931).

Mc CLUNG, L.S., TOABE, R. — The egg yolk plate reaction for the presumptive diagnosis of Clostridium sporogenes and certain species of gangrene and botulinum groups. J. Bact. 53, 139 - 147 (1947).

COOPER, R.F., DENNIS, St. M., Mc MAHON, K.J. — Characterization of Listeria monocytogenes serotype 5. Am. J. Vet. 34, 975 - 978 (1973a).

COOPER, R.F., DENNIS, S.M., HARRIS, J.O. — Fractionation of Listeria monocytogenes serotype 5. Am. J. Vet. Res. 34, 1093 - 1099 (1973b).

COOPER, R.F., DENNIS, S.M. — Further characterization of Listeria monocytogenes serotype 5. Can. J. Microbiol. 24, 598 - 599 (1978).

DONKER-VOET, J. — Serological studies on some strains of Listeria monocytogenes. Tschr. diergeneesk. 82, 341 - 350 (1957).

DONKER-VOET, J. — Listeria monocytogenes: Some biochemical and serological aspects. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 19, 287 - 291 (1972).

EMOEDY, L., RALOVICH, B. — Listeria infection in mice. Proceedings of the Sixth. Int. Symposium-Nottingham 1974, 197 - 205, Leicester University Press 1975.

ENGVALL, E., PERLMANN, P. — Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J. Immunol. 109, 129 - 135 (1972).

FRASER, G. — A plate method for the rapid identification of Listeria (Erysipelothrix) monocytogenes. Vet. Rec. 74, 50 - 51 (1962).

FUZI, M., PILLIS, I. — Production of opacity in egg-yolk medium by Listeria monocytogenes. Nature 196, 195 (1962).

GARVEY, J.S., CREMER, N.E., SUSDORF, D.H. — Methods in immunology. Third ed. Benjamin Inc. Massachusetts (1977).

GIRARD, K.F., SBARRA, A.J., BARDAWIL, W.A. — Serology of Listeria monocytogenes. Characteristics of the soluble hemolysin. J. Bact. 85, 349 - 355 (1963).

HAHN, H. — Effects of dextran sulphate 500 on cell-Mediated resistance to infection with Listeria monocytogenes in mice. Inf. Immun. 10, 1105 - 1109 (1974).

HARVEY, P.C., FABER, J.E. — Some biochemical reactions of the Listerella group. J. Bact. 41, 45 - 46 (1941).

HUNTER, R. — Observations on Listeria monocytogenes type 5 (Iwanow) isolated in New Zealand. Med. Lab. Tech. 30, 51 - 56 (1973).

IVANOV, I. — La Listériose chez les ovins et les caprins. Bull. Off. Internat. Epizoot. 48, 571 - 583 (1957).

IWANOW, I. — Untersuchungen über die Listeriose der Schafe in Bulgarien. Monatsh. Vet. Med. 17, 729 - 736 (1962).

IVANOV, I., MASSALSKI, N. — Listeriosis in Bulgaria. Proceedings of the Seventh Int. Symposium - Varna 1977, 254 - 263, Sofia 1979.

JENKINS, E.M., NJOKU-OBI, A.N., ADAMS, E.W. — Purification of the soluble hemolysins of Listeria monocytogenes. J. Bact. 88, 418 - 424 (1964).

JENKINS, E.M., ADAMS, E.W., WATSON, B.B. — Further investigations on the production and nature of the soluble hemolysins of Listeria monocytogenes. Proceedings of the Third Int. Symposium on Listeriosis, 109 - 123, Bilthoven 1966.

JENKINS, E.M., WATSON, B.B. — Serum protein changes: An activity of the extracellular hemolytic-lipolytic protein from Listeria monocytogenes. Am. J. Vet. Res. 30, 669 - 677 (1969).

JENKINS, E.M., WATSON, B.B. — Extracellular antigens from Listeria monocytogenes. Inf. Immun. 3, 589 - 594 (1971).

KHAN, M.A., SEAMAN, A., WOODBINE, M. — Listeria monocytogenes - haemolysin: lecithinase. Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A 225, 66 - 79 (1973).

LEMELAND, J.-F., ALLAIRE, R., BOIRON, H. — Contribution a l'étude de l'hémolysine de "Listeria monocytogenes" (listeriolysine). Path. Biol. 22, no 9, 763 - 770 (1974).

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 265 - 275, 193 (1951).

NJOKU-OBI, A.N., JENKINS, E.M., NJOKU-OBI, J.C., ADAMS, J., COVINGTON, V. — Production and nature of Listeria monocytogenes hemolysins. J. Bact. 86, 1 - 8 (1963).

ORTEL, S. — Listeriosis in pregnancy and Listeria monocytogenes-excretors in laboratory workers. Proceedings of the Sixth Int. Symposium - Nottingham 1974, 197 - 205, Leicester University Press 1975.

OUCHTERLONY, O. — Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy 6, 30 - 154 (1962).

PATERSON, J.S. — The Antigenic structure of organisms of the genes Listerella. J. Path. Bact. 51, 427 (1940).

SEELIGER, H.P.R. — Listeriose. 2. Aufl., J.A. Barth-Verlag, Leipzig 1958.

SEELIGER, H.P.R. — Listeriosis. Karger, Basel-New York 1961.

SEELIGER, H.P.R., SCHOOFS, M. — Serological analysis of non-haemolyzing Listeria strains belonging to a species different from Listeria monocytogenes. Proceedings of the Seventh Int. Symposium - Varna 1977, 24 - 28, Sofia 1979.

SEELIGER, H.P.R., SCHRETTENBRUNNER, A., ROCOURT, J. — Serological and biochemical studies on Listeria monocytogenes serovar 5. Eighth Int. Symposium on the Problems of Listeriosis, Madrid 1981.

SHANY, S., GRUSHOFF, Ph. S., BERNHEIMER, A.W. — Physical Separation of Streptococcal Nicotinamide Adenine Dinucleotide Glycohydrolase from Streptolysin O. Inf. Immun. 7, 731 - 734.

SIDDIQUE, I.H. — Cytotoxic activity of hemolysin from Listeria monocytogenes on L-M strain of mouse cells. Can. J. Microbiol. 15, 955 - 957 (1969).

SIDDIQUE, I.H., COOPER, G.W. — Hemodynamic effect of listerial hemolysin in dogs. Am. J. Physiol. 216, 1399 - 1403 (1969).

SIDDIQUE, I.H., WILLIAMS, B.B. — Certain effects of Listerial hemolysin on isolated uterus and ileum of rat. Am. J. Vet. Res. 30, 865 - 868 (1969).

SIDDIQUE, I.H., YING, L.C., ROBINSON, B.B. — Hematological and febrile responses of rabbits to Listerial hemolysins. Can. J. Comp. Med. 33, 292 - 295 (1969).

SIDDIQUE, I.H., I-FONG LIN, CHUNG, R.A. — Purification and characterization of hemolysin produced by Listeria monocytogenes. Am. J. Vet. Res. 35, 289 - 296 (1974).

SMYTH, C.J., DUNCAN, J.L. — Thiol-activated (oxygenlabile) cytolysins. In: Bacterial toxins and cell membranes, ed. by Jeljaszewicz, J./Wadström, T., 129 - 183. Academic Press, London 1978.

SWORD, C.P., KINGDON, G.CH. — Listeria monocytogenes Toxin. In: Microbial Toxins, Vol. II A: Bacterial Protein Toxins, ed. by Kadis, S., Montie, Th. C., Ajl, S.J. 357 - 377. Academic Press. New York/London 1971.

WIGGINS, N.J., WILLIAMS, B.B., SIDDIQUE, I.H. — Effects of Listerial hemolysin on perfused isolated rat hearts. Am. J. Vet. Res. 35, 1101 - 1104 (1974).

WILLIAMS, B.B., SIDDIQUE, I.H. — Effects of Listerial hemolysin on rabbit heart. Am. J. Vet. Res. 33, 591 - 597 (1972).

WILLIS, A.T., HOBBS, G. — J. Path. Bact. 75, 299 (1958).

WINTER, A., PERLMUTTER, H., DAVIS, H. — Preparative flat-bed electrofocusing in a granulated gel with the LKB 2117 Multiphor. LKB Application Note 198 (1975).

REZEPTE

Brain-Heart-Infusion-Bouillon mit Glucosezusatz

Brain-Heart-Infusion-Broth (Difco)	37.0 g
Glucose	3.0 g
Aqua dest.	1000,0 ml

20 Minuten bei + 110°C autoklavieren.

Tryptose-Phosphat-Bouillon

Tryptose-Phosphat-Broth (Difco)	29.5 g
Aqua dest.	1000,0 ml

20 Minuten bei + 120°C autoklavieren.

Modifizierte Eigelbagarplatte nach WILLIS (1958)

VL-Base:

Trypsin-Pepsin (Merck)	10 g
Na Cl	5 g
Fleischextrakt (Merck)	2 g
Hefeextrakt (Difco)	5 g
Cystein-H Cl	0.3 g
Agar (Difco)	20 g
Aqua dest.	1000,0 ml

pH 7.3 einstellen

15 Min. kochen und 20 Min bei 120°C autoklavieren.

Eigelbsuspension

Nach gründlicher Reinigung (Hospisept^{R}) wird das Ei unter sterilen Bedingungen gebrochen. Anschließend wird das in einen sterilen Meßbecher gegebene Eigelb mit der gleichen Menge Aqua dest. homogen zu einer Suspension verrührt.

Auf 800 ml des auf etwa 50^{o}C abgekühlten VL-Base-Substrats werden 50 ml Eigelb-Suspension zugegeben; dieses Gemisch gießt man in Petrischalen (8.5 cm ∅) aus (Schichtdicke ca. 7 mm).

Chemisch definiertes Medium zur Hämolysinbildung auf dem Höhepunkt der Hämolysinausscheidung

Lösung A

2 g Na Cl
0.33 g $MgCl_2$
1.0 g Pyruvat
5.0 g Hepes Puffer
ad 1000 ml aqua dest.

Lösung B

80 g K_2HPO_4
14.5 g KH_2PO_4
10 g $(NH_4)SO_4$
5 g Na-Citrat · 2 H_2O
ad 1000 ml aqua dest.

Stammlösungen

Na-Thioglycolat	5 g/100 ml
D-Glucose	20 g/100 ml
$FeCl_3$	1 g/100 ml
Casamino acids (Difco)	5 g/100 ml

Gesamtzusammensetzung

Lösung A	110 ml
Lösung B	12.5 ml
Na-Thioglycolat	1 ml
$FeSO_4$	0.15 ml
D-Glucose	6 ml
Casamino acids	1.4 ml

pH 7.1

Herrn Professor Dr. med. H.P.R. Seeliger danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, für seinen ständigen wertvollen Rat bei der Anfertigung dieser Arbeit und für die an seinem Institut großzügig gewährten Arbeitsmöglichkeiten.

Herrn Professor Dr. med. H. Hof danke ich für seine Anregungen und die Übernahme des Korreferates.

Den Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg sei mein Dank für ihr hilfreiches Entgegenkommen ausgesprochen.

Herrn Professor Dr. rer. nat. W. Goebel, Mitvorstand des Instituts für Mikrobiologie und Genetik der Universität Würzburg, danke ich für die Ermöglichung einiger Experimente in seinem Institut.
Herrn Diplombiologen M. Härtlein gilt mein Dank für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung dieser Versuche.

LEBENSLAUF

Am 4. April 1955 wurde ich als zweites von drei Kindern des Bankvorstandes Heinrich Pongratz und seiner Ehefrau Franziska, geb. Schießl, in Amberg/Oberpfalz geboren.

Nach vier Klassen Volksschule in Amberg besuchte ich von 1965 bis 1974 das Erasmus-Gymnasium Amberg und erlangte dort am 22. Juni 1974 mit dem humanistischen Abitur die allgemeine Hochschulreife. Gleichzeitig mit dem Studium der Geschichte begann ich im Wintersemester 1974/75 an der Universität Regensburg den vorklinischen Teil des Studiums Humanmedizin, den ich im August 1977 mit der Ärztlichen Vorprüfung abschloß.

Nach dem Wechsel an die Julius-Maximilians-Universität Würzburg setzte ich dort das Medizinstudium mit dem klinischen Teil fort, worüber ich im August 1978 den Ersten Teil und im August 1980 den Zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung ablegte.

Vom Februar bis Mai 1979 arbeitete ich im Rahmen eines Studienaufenthaltes im St. Konrads-Missionshospital in Taung/Bophuthwatswana/Südafrika.

Die Ausbildung im "Praktischen Jahr" leistete ich in der Missionsärztlichen Klinik Würzburg, im Juliusspital Würzburg und in der Universitätskinderklinik Würzburg ab.

Nach Bestehen des Dritten Teils der Ärztlichen Prüfung im Oktober 1981 erhielt ich am 2. November 1981 die Approbation als Arzt.

Gerhard Pongratz

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80